

**FÄRBEVERHALTEN MIT PSEUDOISOCYANINCHLORID VON
LEUKOZYTEN BEI NORMALPERSONEN UND PATIENTEN
MIT LEUKÄMISCHEN ERKRANKUNGEN**

HERMANN SCHÖBERL

1902



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. H. Spiess

Färbeverhalten mit Pseudoisocyaninchlorid von
Leukozyten bei Normalpersonen und Patienten
mit leukämischen Erkrankungen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hermann Schöberl

aus

Olching

1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.7.1982



Meiner Frau

gewidmet

Herrn Prof. Dr. J. Suschke, Kinderpoliklinik der Universität München, bin ich zu größtem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1. Material und Methode	2
1.2. Beschreibung der Granulozyten, mononukleären Zellen und Thrombozyten beim Gesunden	3
2. Ergebnisse	6
2.1. Untersuchung eines Vergleichskollektivs	6
2.2. Untersuchung von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen	9
3. Veränderungen an normalen Leukozyten durch chemische und enzymatische Einflüsse	15
4. Diskussion	17
4.1. Klinische Wertigkeit	17
4.2. Biochemie	20
Zusammenfassung	29
Literaturverzeichnis	30

Bei der üblichen Leukämiediagnostik bedient man sich vor allem der panoptischen Färbung des Blutausstriches nach Pappenheim und spezifischer zytochemischer Reaktionen, wie dem Nachweis der Peroxidase, der alkalischen Neutrophilenphosphatase, der unspezifischen Esterase und des Glykogens. Diese Untersuchungen liefern im Allgemeinen eine hinreichend genaue Typisierung der Leukämiezellen. Durch Zufall wurde gefunden, daß sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pseudoisocyaninchlorid durch Vitalfärbung an Leukozyten bestimmte Strukturen darstellen lassen. Pseudoisocyaninchlorid ist ein kationischer Farbstoff, der sich bevorzugt an polyanionische organische Matrizen, wie Glykosaminoglycane, Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure bindet (15, 44). Dabei stellt sich im besonderen bei neutrophilen Granulozyten der Kern dar, während die Lymphozyten eine zusätzliche Granulierung aufweisen. Diese Beobachtung veranlaßte uns, genauere Untersuchungen anzustellen, welcher Wert dieser Erscheinung zukommt und ob es Krankheiten oder Zustände gibt, bei denen sich dieses Phänomen verändert. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von gesunden Personen, Patienten mit den verschiedensten Krankheiten und solche mit hämatologischen Systemerkrankungen untersucht. Daneben wurden eigene Versuche angestellt, Aufschluß über die Natur der dargestellten Lymphozytengranulationen zu erhalten. Über die diagnostische Wertigkeit der Untersuchung wird diskutiert.

1.1. Material und Methode

Zu allen Untersuchungen wurde frisches Venenblut in ein EDTA-Röhrchen überführt. Nach spätestens einer halben Stunde wurden 50 μ l EDTA-Blut mit 50 μ l Farbstofflösung ($5 \cdot 10^{-4}$ M Pseudoisocyaninchlorid, PIC) in einem weiteren EDTA-Röhrchen vermischt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die anschließend angefertigten Ausstriche wurden getrocknet und meistens am selben Tag untersucht. Zur Auswertung diente ein Fluoreszenzmikroskop "Ortholux II" von Leitz mit einem Ölimmersionsobjektiv 100/1,30. Die Präparate wurden in Auflichtfluoreszenz mit einer Xenon Hochdrucklampe 75 in Verbindung mit einem Blauerregerfilter BG 12 (Leitz) und einem Sperrfilter TG 510 (Leitz) untersucht. Photographische Aufnahmen erfolgten mit Ektachrome Highspeed (Kunstlicht), bei einer Belichtungszeit von 18-20 Sek. Das native Blut kann zur Gerinnungshemmung auch mit einer definierten EDTA- oder Heparinlösung versetzt werden. Bewährt haben sich eine 0,2% EDTA-in-NaCl-Lösung, 1:1 mit Blut vermischt, oder ein Zusatz von 1 IE Heparin/ml Blut. Zu hohe Konzentrationen sowohl von EDTA als auch von Heparin lassen die Färbung zu intensiv und verwaschen erscheinen. Durch die besondere Affinität von PIC zu anionischen Substanzen erklärt es sich, daß das Ergebnis der Färbung vom pH-Wert abhängt. Bei der obengenannten Methode hält sich der pH-Wert annähernd im neutralen Bereich. Wegen der begrenzten Haltbarkeit der PIC-Lösung empfiehlt es sich, diese monatlich zu erneuern.

1.2. Beschreibung der Granulozyten, mononukleären Zellen und Thrombozyten beim Gesunden.

Bei der Färbung von EDTA-Blut mit einer $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ PIC-Lösung findet man, verglichen mit der Pappenheim-Färbung, umgekehrte Verhältnisse vor. Die Granulozyten, deren Name von der Granulierung ihres Zellplasmas herrührt, weisen in der hier beschriebenen Fluoreszenzfärbung keine Granula, oder nur ganz vereinzelt ein oder zwei Granula, auf (Abb.1). Der Zellkern ist scharf vom Zellplasma abgesetzt und fluoresziert von grün bis gelb. Im Zellplasma erscheinen oft unscharfe, nur sehr schwach gelb bis bräunlich fluoreszierende Strukturen, die keinerlei Ähnlichkeit mit Granula aufweisen. Vakuolen sind an ihrer tiefschwarzen Farbe und ihrer meist kreisrunden Form leicht zu erkennen. Die Untergrundfluoreszenz des Zytoplasmas variiert zwischen grauen und grünlichen Farbtönen. Während die Untergrundfluoreszenz der neutrophilen Granulozyten homogen ist, findet sich bei den Eosinophilen eine reichliche Vakuolisierung (Abb.1). Diese Vakuolen entsprechen in Größe und Form den roten, eosinophilen Granula der Pappenheim-Färbung. Zwischen diesen, wie in das Zytoplasma eingestanzten, schwarzen Vakuolen lassen sich immer einige gelbe und grüne Granula nachweisen. Der Kern der eosinophilen Granulozyten fluoresziert wie bei den neutrophilen grün bis gelb. Im Gegensatz dazu sind die basophilen Granulozyten dicht mit gelb fluoreszierenden, runden Granula bepackt.

Die Lymphozyten besitzen einen grün bis gelben Kern, der in wenigen Fällen auch braun erscheint (Abb. 2). Der Kern ist scharf vom schwach grünlich fluoreszierenden Zytoplasma abgegrenzt. Über das Zytoplasma verteilt lassen sich in jedem Fall mehrere bis viele grüne und gelbe Granula nachweisen, die in ihrer Größe den bei der Pappenheim-Färbung in Granulozyten zu findenden Granula entsprechen (0,2-0,5 μm).

Ähnliche Granula finden sich auch in den Monozyten, die sich, wie auch in der Pappenheim-Färbung, durch Größe und Kernform von den Lymphozyten unterscheiden. Die Thrombozyten zeichnen sich durch eine gelb-grünliche Untergrundfluoreszenz aus, die bisweilen durch nicht fluoreszierende Stellen unterbrochen wird. Regelmäßig lassen sich in den dünn ausgestrichenen Arealen Pseudopodien, die von den Blutplättchen ausgehen, nachweisen. Unregelmäßig lassen sich in den Thrombozyten ca. 2-5 gelbe Granula anfärben, die vor allem in den dünn ausgestrichenen Stellen auffallen. Erythrozyten weisen keine Fluoreszenz auf, was durch den fluoreszenzlöschenden Eisengehalt dieser korpuskulären Blutelemente bedingt ist.

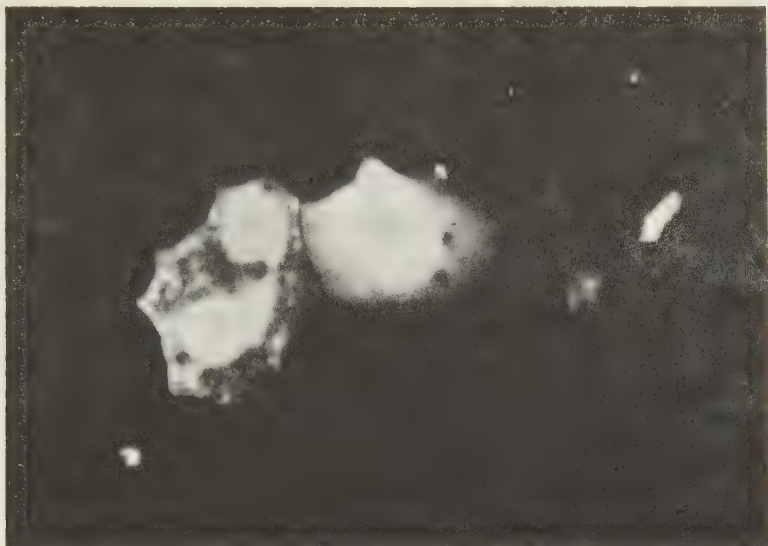


Abb. 1: Neutrophiler (re) und eosinophiler (li) Granulo-
zyt. Daneben einzelne Thrombozyten.



Abb. 2: Lymphozyt mit (etwas verschwommener) Granu-
lierung.

2. Ergebnisse

2.1. Untersuchung eines Vergleichskollektivs.

Als Vergleichskollektiv dienten 100 Patienten und gesunde Mitarbeiter der Kinderpoliklinik. Nach der oben beschriebenen Methodik wurde bei jedem die Anzahl der eindeutig granulierten Lymphozyten auf je 100 bestimmt.

Bei jedem der 100 Fälle waren mindestens 97% der Lymphozyten granuliert, bei 88 Fällen sogar 100%. Im einzelnen handelt es sich um folgende Fälle:

Alter	Diagnose	Medikation	gran.Ly.%
1.I.T.	32♀ gesund		100
2.A.W.	17♂ Neurose		100
3.J.B.	18♂ Enteritis		100
4.E.D.	15♀ Lupus erythem.	Steroide, Chloroquin	100
5.B.D.	16♀ Juv. Polyarthr.	Gold	100
6.A.M.	10♂ Augenverletzung		100
7.C.L.	9♂ Anfallsleiden	Primidon	100
8.P.E.	20♀ Chron. Polyarthr.	Piroxicam	100
9.E.K.	7♀ Juv. Oligoarthr.	Indometacin	100
10.P.J.	14♀ Juv. Oligoarthr.	Chloroquin, Piroxicam	100
11.A.J.	16♀ Juv. Oligoarthr.	Chloroquin, Indometacin	100
12.V.M.	6♀ gesund		100
13.Y.M.	12♂ M. Behçet	Steroide	100
14.M.W.	22♂ Osteogenesis imp.	Cyanidol-3	100
15.P.E.	7♀ Tonsillitis		100
16.A.S.	11♀ Anfallsleiden	Valproinat	100
17.C.W.	6♀ Juv. Oligoarthr.	Gold, Indometacin	99
18.M.H.	13♂ Uveitis		99
19.S.E.	2♂ Enteritis		100
20.J.S.	45♂ gesund		98

21.M.E.	35♀	Thrombopathie		100
22.M.E.	3♀	Monarthrititis		100
23.S.K.	14♀	Pyelonephritis		99
24.H.K.	14♀	part. Faktor XIII-Mangel		100
25.L.K.	7♂	Konjunktivitis		100
26.R.H.	12♂	gesund		100
27.M.S.	16♀	Tuberkulose	Ethambutol, INH	100
28.N.Y.	20♀	resp. Infekt		100
29.H.O.	46♀	gesund		100
30.A.P.	1M♂	Zystennieren		100
31.A.H.	1M♂	Vitium cordis		100
32.I.M.	4♀	resp. Infekt		100
33.F.S.	2M♂	gesund		100
34.B.Ö.	1W♂	Frühgeburt		100
35.A.J.	8♂	Silver-Russel-Sy.		99
36.F.S.	9♂	Appendizitis		97
37.U.W.	12♀	resp. Infekt		100
38.B.H.	8♀	Juv. Arthritis		100
39.C.D.	7♂	Enteritis		100
40.D.B.	1W♂	Frühgeburt		100
41.A.K.	13♂	Oligoarthrititis	Indometacin	100
42.C.K.	16♀	Bronchitis	Aminophyllin	100
43.S.C.	4♂	gesund		100
44.N.F.	5♀	gesund		99
45.C.R.	13♂	gesund		100
46.B.E.	12♀	gesund		100
47.B.S.	15♀	M. Still		100
48.T.L.	13♂	Infektarthrititis		100
49.K.M.	12♀	Glomerulonephritis	Penicillin	100
50.A.B.	24♂	Epilepsie	Phenytoin	100
51.T.G.	11♂	gesund		100
52.S.S.	12♀	Hundebiß		99
53.R.Z.	13♂	Polyarthrititis	Indometacin	100
54.C.M.	14♀	Polyarthrititis	Chloroquin, Indometacin	100
55.J.V.	8♂	Bauchschmerzen		100
56.K.S.	9♂	Minderwuchs		100
57.C.R.	6♀	Aortenisthmusstenose		100
58.B.G.	2♀	Adenoide		100
59.W.B.	32♀	Polyarthrititis	Piroxicam	100
60.A.B.	9M♂	resp. Infekt		99

61.N.R.	9♂ Sinubronchitis		100
62.F.S.	9♀ Tetraspastik		100
63.E.H.	2W♂ Hydrocephalus		100
64.F.U.	4W♂ gesund		100
65.Y.H.	3♀ Neurodermitis		99
66.M.J.	9♂ Plattfüße		100
67.M.L.	3♀ gesund		100
68.A.R.	12♂ Polyarthritits	Indometacin	100
69.G.M.	10♂ Pseudoxanthoma elast.		100
70.M.J.	11♀ Scharlach	Penicillin	100
71.A.W.	13♂ gesund		100
72.S.B.	14♂ Hypogenitalismus		100
73.B.M.	12♀ Psoriasis-Arthr.	D-Penicillamin	100
74.T.A.	9♂ Sinusitis		100
75.J.E.	1♂ resp. Infekt		100
76.C.B.	2♂ Tonsillitis		100
77.J.S.	8♀ Verletzung		100
78.K.P.	4♂ gesund		100
79.K.B.	11♀ gesund		100
80.R.K.	18♂ Down-Syndrom		100
81.M.H.	16♀ Ptosis		100
82.M.H.	21♀ gesund		100
83.k.K.	48♂ gesund		100
84.S.P.	14♀ Osteomyelitis	Oxacillin, Ampicillin	100
85.J.W.	5♂ Virusinfekt		100
86.M.K.	12♀ Myopathie		100
87.N.W.	8♀ Polyarthritits	Gold, Indometacin, ACTH	99
88.A.B.	14♂ Proteinurie		100
89.H.R.	1♂ Virusinfekt		100
90.R.F.	6♂ Pneumonie	Ampicillin	100
91.M.A.	16♂ Hypotonie		100
92.A.L.	11♀ postinfekt. Arthr.		100
93.M.E.	4♀ Juv. Oligoarthr.		100
94.R.K.	17♂ Willebrand-Jürgens-Sy.		100
95.C.P.	43♂ gesund		100
96.N.J.	7♀ Retinitis		99
97.C.W.	7♀ Oligoarthritis		100
98.N.S.	16♀ gesund		99
99.C.R.	5♀ Adenoide		99
100.B.B.	44♀ V.a. Eosinophiles Granulom		100

2.2. Untersuchung von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen.

Um festzustellen, ob hämatologische Systemerkrankungen eine Veränderung am P10-gefärbten Blutbild hervorrufen können, wurden die Ausstriche von 15 Patienten dieser Krankheitsgruppe, v. a. mit leukämischen Erkrankungen untersucht. Es sollen im folgenden die einzelnen Fälle dargestellt werden. Die methodische Schwierigkeit der eindeutigen Zelldifferenzierung machte es notwendig, bei manchen Ausstrichen anstatt des Prozentsatzes der granulierten Lymphozyten, den der granulierten rundkernigen oder mononukleären Zellen zu bestimmen.

1) J.K. 46q. Seit einem Jahr ist eine akute myeloische Leukämie bekannt. Befindet sich jetzt in Vollremission und steht unter einer zytostatischen Erhaltungstherapie mit 6-Merkeptopurin und Methotrexat, abwechselnd mit Daunorubicin und Vincristin. Das Blutbild: Hb 13,6; Thr 166 000; Lk 4400, davon 2 Stabkernige, 48 Segmentkernige, 1 Eosinophiler, 1 Basophiler, 31 kleine und 11 große Lymphozyten, 1 lymphoide Zelle, 4 Monozyten auf 100 Zellen. Im P10-gefärbten Ausstrich sind 99% der Lymphozyten granuliert.

2) E.T. 75q. IgA- λ -Paraproteinämie, ferner Koronare Herzkrankung. Im Knochenmark kein Hinweis auf ein Plasmozytom.

Therapie mit Digoxin, Glyceryltrinitrat, Propafenon. Das Blutbild: Hb 16,4; Thr 134 000; Lk 6400. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 99% der Lymphozyten granuliert.

3) L.S. 61q. Seit 3 Jahren Polycythämia vera, daneben Hypertonie und komp. Niereninsuffizienz. Behandlung durch Plasmapherese alle 6 Wochen, Digoxin, Dihydralazin, Propranolol. Das Blutbild: Hb 12,7; Thr 508 000; Lk 18000. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 100% der Lymphozyten granuliert.

4) J.K. 24♂. Seit einem Jahr ist ein Lymphoblastom Stadium II A bekannt. Der Patient wurde bestrahlt und erhält jetzt die erste Stoßtherapie nach dem CHOF-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison). Das Blutbild: Hb 14,5; Thr 184 000; Lk 6700. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 100% der Lymphozyten granuliert.

5) R.H. 45♂. Chronisch-lymphatische Leukämie seit einigen Jahren, jetzt in ein Lymphoblastom übergehend (Lymphknoten-Histologie: lymphozytisches malignes Lymphom mit prolymphozytischer und lymphoblastischer Komponente). Zusätzlich IgM-Paraproteinämie und Antikörpermangelsyndrom. Therapie mit Chlorambucil, Prednison und Nystatin, ohne Remission. Das Blutbild: Thr 60-80 000; 1 Myelozyt, 1 Metamyelozyt, 7 Stabkernige, 17 Segmentkernige, 1 Eosinophiler, 25 kleine und 21 große Lymphozyten, 11 lymphoide Zellen, 14 Lymphoblasten, 2 Monozyten auf 100 Zellen. Mehrere atypische Lympho-

zyten mit eingekerbten Zellkernen und spärlichem Zytoplasma. Mehrere unreife lymphatische Zellen mit mehreren Nukleolen. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 96% der Lymphozyten granuliert.

6) R.W. 54♂. Seit 3 Jahren eine chronisch-myeloische Leukämie (Philadelphia Chromosom +), jetzt zusätzlich Herzinsuffizienz und Pleuritis. Therapie mit Busulfan, Digoxin, Allopurinol. Das Blutbild: Hb 11,6; Thr 200 000, Lk 36 000, davon 8 Stabkernige, 20 Segmentkernige, 21 Eosinophile, 5 Metamyelozyten, 4 Lymphozyten, 20 Blasten, 25 monozytäre Zellen. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind ca. 60% der rundkernigen Zellen granuliert.

7) I.S. 16♀. Seit 4 Monaten eine akute lymphatische Leukämie. Behandlung mit Cytosinarabinosid, Thioguanin, Prednison, Pimaricin, Nystatin, Colistin, Amphotericin B. Das Blutbild: Hb 7,9; Thr 60 000; Lk 3800, davon 1 Metamyelozyt, 7 Stabkernige, 8 Segmentkernige, 19 kleine und 16 große Lymphozyten, 3 lymphoide Zellen, 46 Blasten auf 100 Zellen. Das Knochenmark ist uniform und enthält keine Megakaryozyten. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 99% der rundkernigen Zellen granuliert.

8) E.E. 54♀ hat seit eineinhalb Jahren eine akute monozytäre Leukämie. Antibiotische Therapie mit Cefoxitin, Tobramycin, Azlocillin, Cotrimoxazol, Colistin, Amphotericin B

Loperamid. Das Blutbild: Hb 11,0; Thr 17 000; Lk 6200, davon 1 Myelozyt, 2 Metamyelozyten, 1 Segmentkerniger, 1 Eosinophiler, 3 Basophile, 19 kleine und 3 große Lymphozyten, 4 Monozyten, 66 Monoblasten auf 100 Zellen. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 99% der rundkernigen Zellen granuliert.

9) A.B. 46♂, hat seit kurzer Zeit eine B-Zell-Lymphadenose, Stadium I ohne Knochenmarksbeteiligung. Keine Therapie. Das Blutbild: Hb 19,1; Thr 140 000; Lk 42 800, davon 3 Stabkernige, 12 Segmentkernige, 2 Eosinophile, 60 kleine und 18 große Lymphozyten, 3 lymphoide Zellen, 2 Monozyten auf 100 Zellen. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 98% der Lymphozyten granuliert.

10) A.S. 69♀. Seit 3 Jahren chronisch-lymphatische Leukämie, jetzt Antikörpermangelsyndrom. Therapie mit Chlorambucil und Prednison. Das Blutbild: Hb 10,2; Thr 43 000; Lk 47 200, davon 95% Lymphozyten. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 100% der Lymphozyten granuliert.

11) J.MT. 67♀. Seit 9 Jahren chronisch-myeloische (megakaryozytäre) Leukämie. Therapie mit Dibrommannitol. Im Knochenmark Vermehrung aller 3 Zellreihen. Das Blutbild: Hb 9,0; Thr 200 000; Lk 18 600, davon 2 Myeloblasten, 7 Promyelozyten, 4 Myelozyten, 7 Metamyelozyten, 16 Stabkernige, 49 Segmentkernige, 5 Eosinophile, 7 Basophile, 4 kleine 1 großer Lymphozyt, 1 lymphoide Zelle, 8 Mono-

zyten auf 100 Zellen. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind ca. 77% der lymphoiden Zellen granuliert. Daneben finden sich reichlich atypische, kernlose, etwa 8 μ m große Zellen mit feiner, netzartiger Fluoreszenz, bis hin zu grobfleckigen, inhomogenen Strukturen mit Vakuolen und gelegentlichen Granula.

12) J.D. 19Mon ♂, hat eine akute unklassifizierbare Leukämie. Das Blutbild vor Therapiebeginn: Thr 348 000; Lk 4300, davon 1 Myelozyt, 2 Stabkernige, 1 Eosinophiler, 94 Lymphozyten, 2 Monozyten. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 95% der mononukleären Zellen granuliert. Obwohl über die Beurteilung eines PIC-gefärbten Knochenmarksausstriches nicht genügend Erfahrungen vorliegen, ist auffällig, daß fast alle mononukleären Zellen im Knochenmark nicht granuliert sind.

13) J.W. 50♂. Akute lymphatische Leukämie. Das Blutbild vor Therapie: Thr 46 000; Lk 48 000, davon 2 Stabkernige, 7 Segmentkernige, 23 Lymphozyten, 1 Monozyt, 67 atypische Zellen (Blasten). Im PIC-gefärbten Ausstrich findet man am 11.8. 0% granuliert mononukleäre Zellen.

17.8. Transfusion und zytostatische Therapie nach Riehm

(Adriamycin, Vincristin, Prednisolon)

18.8. 90% granuliert mononukleäre Zellen,

19.8. 80% granuliert mononukleäre Zellen,

25.9. 88% granuliert mononukleäre Zellen,

im Knochenmark fast alle Zellen ungranuliert.

14) J.L. 12♂. Akute myeloische Leukämie, erstes Rezidiv. Keine Therapie vor geplanter Knochenmarkstransplantation. Das Blutbild: Thr 214 000; Lk 5400, davon 1 Stabkerniger, 51 Segmentkernige, 1 Eosinophiler, 44 Lymphozyten, 3 Monozyten. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 93% der mononukleären Zellen granuliert.

15) M.H. 3♂. Akute myeloische Leukämie. Therapie mit Doxorubicin, Cytosinarabinosid. Das Blutbild: Thr. 138 000; Lk 1500, davon 4 Stabkernige, 33 Segmentkernige, 1 Eosinophiler, 48 Lymphozyten, 14 Monozyten. Im PIC-gefärbten Ausstrich sind 95% der mononukleären Zellen granuliert.

3. Veränderungen an normalen Leukozyten durch chemische und enzymatische Einflüsse.

Die Ergebnisse der Färbung und die chemischen Eigenschaften des Farbstoffes legen die Vermutung nahe, daß es sich bei der dargestellten Granulierung der Lymphozyten um biochemische Strukturen an der Zelloberfläche handelt. Um einen groben Aufschluß über die Natur dieser Strukturen zu gewinnen, wurden normale Zellen verschiedenen enzymatischen und chemischen Einflüssen ausgesetzt und die Veränderungen ausgewertet. Zuerst ist zu bemerken, daß sich die Granula nur nachweisen lassen, wenn das Blut innerhalb einer Stunde gefärbt wird. Später nimmt die Fluoreszenz rasch ab. In einer Reihe von Versuchen wurde Blut von gesunden Spendern mit folgenden Enzymen inkubiert:

1. Neuraminidase, 2. Chondroitinase ABC, 3. Ribonuklease A, 4. Phospholipase C.

Dabei zeigte sich weder nach Einwirkung von Neuraminidase, noch von Chondroitinase ABC, noch von Ribonuklease A eine nennenswerte Veränderung der Färbeargebnisse. Nach der Behandlung mit Phospholipase C ergaben sich gewisse Unterschiede. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

100 µl Heparin-Blut (1 IE/ml) wurden mit 5-10 µl Phospholipase C Lösung (Typ V aus *B. perezus*, 460 U/mg Protein, Sigma) 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend mit 100 µl PIC vermischt und weitere 30 Minuten bei Zimmer-

temperatur stehen gelassen. In der anschließend angefertigten Ausstrichen zeigten sich 30 - 50% der Leukozyten, vor allem die Granulozyten destruiert, mit überdimensional großen und unregelmäßig begrenzten Zelleibern. Bei den überlebenden differenzierbaren Zellen zeigte der überwiegende Teil der Lymphozyten keine Granula, während viele Granulozyten granuliert waren. Dieser Befund ließ sich jedoch nur in ca. 50% der Ansätze, abhängig von der Enzymkonzentration reproduzieren.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß von Chloroform und Benzol auf Leukozyten untersucht. Dazu wurden 100 µl EDTA-Blut mit 10 µl Chloroform bzw. Benzol gemischt, kurz geschüttelt und nach 10 Minuten mit 100 µl PIC 30 Minuten lang gefärbt. Diesmal war die Struktur der Leukozyten erhalten. Alle Lymphozyten waren degranuliert, die Granulozyten granuliert. Beide Ergebnisse ließen sich reproduzieren.

4. Diskussion

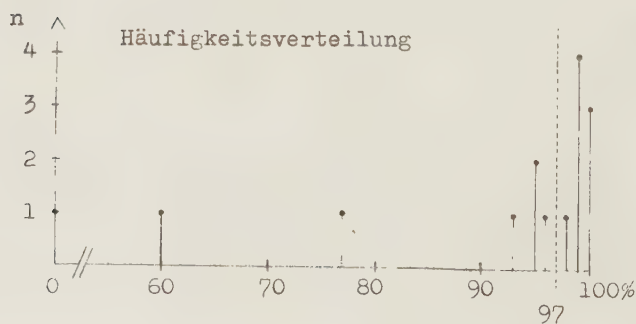
4.1. Klinische Wertigkeit

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, erste Anhaltspunkte über die klinische Relevanz unserer Beobachtungen zu gewinnen. Die Untersuchung eines Kollektivs von 22 Gesunden und 78 Kranken (48 ♀ + 52 ♂) ergab bei jedem mindestens 97% granulierte Lymphozyten. Bei 88 von 100 Fällen waren 100% der Lymphozyten granuliert. Die 12 Beobachtungen mit weniger als 100% verteilen sich auf 9 ♀ und 3 ♂, davon 3 Gesunde mit 98, 99, 99% granulierten Lymphozyten. Das Alter scheint keinen Einfluß zu haben: Von den 8 25-48jährigen liegt einer unter 100%. Ebenso hat von den 8 0-1jährigen einer weniger als 100% Granulationen. Unter den 78 Kranken sind 48 mit entzündlichen oder Infektionskrankheiten, mit einem Verhältnis von 29 ♀ zu 19 ♂. Von diesen 48 Kranken liegen 8 (von insgesamt 12) unter 100%, davon 5 ♀ und 3 ♂, so daß sich hier nicht eine Prävalenz für das weibliche Geschlecht, sondern für die Gruppe der entzündlichen und infektiösen Krankheiten abzeichnet. Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir den Normalbereich vorläufig mit 97 - 100% granulierten Lymphozyten festgelegt.

Die Patienten mit hämatologischen Erkrankungen sind der Übersicht halber nochmals in einer Tabelle zusammengestellt. Die Befunde bei den einzelnen Patienten sind sehr unter-

Alter	Diagnose	Verlauf	Ther.	Befund
1. 46♀	AML	Rem.	Z	99 %
2. 75♂	IgA-Paraproteinämie	-	A	99 %
3. 61♀	Polycyth. vera	-	A	100 %
4. 24♂	Lymphoblastom	-	Z	100 %
5. 45♂	CLL	progr.	Z	96 %
6. 54♂	CML	progr.	Z	60 %
7. 16♀	ALL	progr.	Z	99 %
8. 54♀	AMonoL	progr.	A	99 %
9. 46♂	B-Zell Lymphadenose	-	-	98 %
10. 69♀	CLL	-	Z	100 %
11. 67♀	CML	progr.	Z	77 %
12. 19M♂	AUL	progr.	-	95 %
13. 5♂	ALL	-	-	0 %
	nach Therapie		T+Z	80-90 %
14. 12♂	AML	Rez.	-	93 %
15. 3♂	AML	progr.	Z	95 %

Therapie: Z= zytostatisch, A= allgemein, T= Transfusion.



schiedlich. Für die berechtigte Vermutung, daß es sich bei den nicht granulierten mononukleären Zellen um unreife Vorstufen oder Blasten, sei es der lymphatischen oder der myeloischen Reihe, handelt, ergeben sich nicht in jedem Fall Indize. So korreliert bei Fall 6 das Blutbild mit dem Verhältnis von 20 Blasten zu 30 Lymphozyten und monozytären Zellen gut mit dem Befund von 60% granulierten rundkernigen Zellen. Dagegen finden sich bei 13 unter 23 Lymphozyten und 67 Blasten im Blutbild keine Granulationen. Umgekehrt sind im Fall 7 bei einem Verhältnis von 38 Lymphozyten und lymphoiden Zellen zu 46 Blasten 99% der rundkernigen Zellen granuliert. Ähnlich ist das Ergebnis von Fall 8. Es gibt also gewisse Unterschiede im Ergebnis unserer Färbung, abhängig möglicherweise von Zellart, Verlauf, Malignität, Therapie. Bemerkenswert ist, daß der Befund der vier nicht-leukämischen Erkrankungen, darunter zwei proliferative B-Zell Erkrankungen, im Normbereich ist. Der interessanteste Fall ist Nr. 13, der als einziger 0% Granulationen aufweist. Daß 7 Tage später anhaltend 80 - 90% der Lymphozyten granuliert sind, läßt sich mit der Transfusion allein (bei einem Ausgangswert von 48 000 Lk) nicht erklären. D. h. die eingreifende zytostatische Therapie muß nicht nur die Proliferation der malignen Zellen gebremst haben, sondern auch an deren Membran Veränderungen bewirkt haben. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß wir bei Leukämien überwiegend einen erniedrigten Prozentsatz an granulierten

Lymphozyten gefunden haben (7 Fälle), aber auch normale Werte (4 Fälle), unabhängig davon, ob es sich um lymphatische oder myeloische Leukämien handelt. Die vier nicht-leukämischen Erkrankungen sind im wesentlichen mit dem Normalkollektiv vergleichbar.

Eine differenziertere Aufschlüsselung der Korrelation von Granulierung und klinischer Symptomatik oder Verläufen wird sich nur an größeren Kollektiven von Leukämiekranken erreichen lassen. Interessant wären hier Längsschnittstudien in Hinblick auf Remission/Progredienz, Übergang in eine andere Verlaufsform, Therapie und Untersuchungen an Zellkulturen.

4.2. Biochemie

Die Zellmembran ist ein komplexes, dynamisches Gebilde und ihre Struktur und Zusammensetzung ist Gegenstand intensiver Forschung. Eine wichtige Grundlage dazu ist seit 1972 das Flüssigkeits-Mosaik-Modell von SINGER und NICOLSON (42). Nach diesem Modell befinden sich die Membranlipide in einer Doppelschicht mit flüssigkeitsähnlichem Aggregatzustand. In der Doppelschicht ragen die hydrophoben Fettsäurereste

zueinander nach innen und die polaren Phosphat-, Cholin-, Äthanolamin- u. a. Gruppen nach außen. In dieser Doppelschicht sind Proteine "gelöst" (sog. integrale Proteine), die zum Teil durch die ganze Membran hindurchragen und die in der Ebene der Lipidschicht, in Abhängigkeit von Größe, Temperatur und Viskosität frei diffundieren können. Die Mikroviskosität innerhalb der Membran wird mit dem 10^3 - 10^4 fachen der von Wasser angegeben. An der Außenseite der Membran befinden sich Oligosaccharide, sowohl an Proteine, wie auch an Lipide gebunden und die "peripheren" Proteine, sogenannte, weil sie sich leicht von der Membran ablösen lassen. Durch ihre Beweglichkeit sind die strukturellen und funktionellen Bestandteile dieser Doppelschicht statistisch verteilt mit Ausnahme von bestimmten Aggregaten, d. h. Proteinen, die untereinander eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung eingehen oder Protein-Lipid-Komplexe, die aufgrund ihrer Größe nur bedingt diffundibel sind. So nimmt man z. B. an, daß die Atmungskettenenzyme in der Mitochondrienmembran benachbart sind. WEISS (48) hat festgestellt, daß die Neuraminsäurereste an der Erythrozytenmembran in Gruppen angeordnet sind, mit einer Dichte von mehr als 30 negativen Ladungen/ 80 nm^2 . Nach NICOLSON (32) u. a. können bestimmte integrale Proteine auch durch membran-assoziierte Mikrotubuli oder Mikrofilamente aktiv seitlich verlagert werden.

Über die biochemische Zusammensetzung der Zellmembran liegen genauere Kenntnisse vor. Nach LUCY (24) ist die Zellwand bezüglich der Lipidzusammensetzung asymmetrisch. So finden sich z. B. in der Außenseite der Erythrozytenmembran fast ausschließlich cholinhaltige Lipide wie Lezithin und Sphingomyelin, sowie Cholesterin, im Gegensatz zur Innenseite, die bevorzugt aus phosphatidylserin- und phosphatidyläthanolaminhaltigen Lipiden besteht. Die Fettsäureketten liegen dabei zwischen C_{12} und C_{22} , mit bis zu sechs Doppelbindungen. Die gesättigten Ketten befinden sich überwiegend in Position 1 und die ungesättigten in Position 2 (siehe auch 19). Das Cholesterin kann sowohl einen verdichtenden, als auch einen verflüssigenden Effekt auf die Membranviskosität haben, je nach der Übergangstemperatur der Lipide (24, 11, 18, 25, 41).

Die membrangebundenen Oligosaccharide enthalten vor allem N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Glucosamin und -Galaktosamin, Glucose und Galaktose. Diese Zuckerreste sind vor allen Dingen, neben den Membranproteinen, verantwortlich für die Antigenität der Zelle. Die negative Ladung der Carboxyl-Gruppen trägt mit bei zu einer negativen Gesamtoberflächenladung, die allen Vertebratenzellen eigen ist, und damit zu einer Beweglichkeit der Zelle im elektrischen Feld. Durch enzymatische Behandlung mit Neuraminidase läßt sich sowohl N-Acetyl-Neuraminsäure von den Zellen abspalten, als auch die elektrophoretische Beweglichkeit der Zellen vermindern (4, 35, 28, 48, 49, 50).

MEHRISHI (28) hat aus elektrophoretischen Daten versucht, quantitative und qualitative Aussagen über die Ladungen der Lymphozytenoberfläche zu machen. Er kommt dabei auf eine Gesamtoberflächenladung von $103,9 \cdot 10^5$ Elektronenladungen, davon $93,4 \cdot 10^5$ negative und $9,5 \cdot 10^5$ positive Ladungen. Die positiven Ladungen werden von Aminogruppen gebildet, die negativen Ladungen zu 31% von N-Acetyl-Neuraminsäure, zu 9% von RNA-Phosphat-Resten, die restlichen 60% von bisher nicht identifizierten Gruppen. Daneben existieren noch Sulfhydryl-Reste mit insgesamt $19,8 \cdot 10^5$ Elektronenladungen je Lymphozyt. Die Anwesenheit von RNA an der Zelloberfläche wurde zuerst von WEISS und MAYHEW (50) 1966 beschrieben, die u. a. nachweisen konnten, daß die Einwirkung von RNase auf Zellen deren elektrophoretische Beweglichkeit vermindert. Die Bedeutung dieses Phänomens ist noch nicht geklärt. LESSEPS (21) entdeckte an der Außenseite von embryonalen Hühnerzellen eine mit Lanthan anfärbbare, elektronenmikroskopisch darstellbare Schicht, die nur durch Phospholipase C, nicht durch Trypsin, Pronase, EDTA, DNase, α -Amylase, Neuraminidase oder N-Acetyl-Cystein ablösbar war. Über die Beschaffenheit dieser Struktur konnte er keine Aussage machen. Durch Fixieren mit Glutaraldehyd und anschließendes Färben mit kolloidalem Eisen bei pH 1,8 konnte NICOLSON (31) auf Kaninchen-Erythrozyten und Mäuse-Myelom-Zellen eine getüpfelte Verteilung der anionischen Gruppen darstellen. Nach Inkubation mit Neuraminidase, Proteinasen, Phospho-

lipasen und pH-Wechsel verschwand die Färbung. Der Autor schließt dabei ein Artefakt nicht aus.

Bei der viralen oder chemischen Transformation zur malignen Zelle, bzw. beim Vergleich: gesunde Zelle - Tumorzelle, ergeben sich vielfältige biochemische Veränderungen an der Zelloberfläche. Ähnliche Veränderungen entstehen häufig durch enzymatische Behandlung der Zellen. So agglutinieren bestimmte pflanzliche Proteine, sog. Lectine, nur maligne transformierte Zellen, aber keine gesunden Zellen. Eine Agglutination läßt sich aber auch durch Einwirken von Proteasen auf gesunde Zellen herbeiführen. BURGER (zit. nach 42 und 26) erklärt dies mit einer Demaskierung der Lectin-Rezeptoren, sowohl durch die Protease, als auch durch Syntheseverminderung in der maligne transformierten Zelle. Dagegen führen SINGER und NICOLSON (42) die Agglutinierbarkeit auf eine erhöhte Beweglichkeit der Lectin Rezeptoren in der Membran zurück. Sowohl durch proteolytische Abspaltung von Eiweißresten, als auch durch veränderte Synthese sollen die Membranproteine hydrophober und beweglicher werden, dadurch leichter aggregieren und so eher eine interzelluläre Brückenbildung durch Lectine ermöglichen. BORYSENKO und WOODS (7) untersuchten Bindungsstellen von polykationisiertem Ferritin an embryonalen Mäusefibroblasten. Während sich bei gesunden Zellen das Ferritin in ca. 0,1 μm großen Haufen mit Zwischenräumen von ca. 0,5 μm anlagerte, waren auf SV 40-Virus trans-

formierten Zellen die Rezeptoren gleichmäßig verteilt. Nach einer kurzzeitigen proteolytischen Behandlung zeigten normale Fibroblasten das gleiche Bild wie transformierte. INBAR, SHINITZKY und SACHS (18, 17) konnten nachweisen, daß bei humaner CLL, wie beim Mäuse Lymphom, die Mikroviskosität der Zellwand vermindert ist. Sie erklären diese Beobachtung mit einem gleichzeitig festgestellten, erniedrigten Membran-Cholesteringehalt. So zeigte sich u. a., daß der artefizielle Einbau von Cholesterin in die Zellwand bei Mäuselymphomzellen deren Malignität schwächt (17 INBAR u. SHINITZKY). Das Membran-Cholesterin scheint mit dem Serum-Cholesterin in einer Art Gleichgewicht zu stehen, da es sich leicht herauslösen und leicht einbauen läßt (41).

Viele Untersucher befaßten sich mit der Zellelektrophorese, um Unterscheidungskriterien von malignen und gesunden Zellen zu gewinnen. RUEFF (35) und RUHENSTROTH-BAUER (37) stellten fest, daß leukämische Lymphozyten im Vergleich zu gesunden eine größere Beweglichkeit im elektrischen Feld besitzen. MAYHEW und WEISS (27) fanden einen geringen bis mäßigen Unterschied in der Elektrophorese von normalen und malignen Lymphozyten, je nach Art der Leukämie. AMBROSE (2) postulierte, daß die negative Oberflächenladung maligner Zellen größer ist, als die normaler Zellen. COOK und JACOBSON (9) beobachteten bei Mäusen eine größere elektrophoretische Beweglichkeit von Lymphknoten-zellen gegenüber vergleichbaren Zellen einer akuten

Lymphoblastenleukämie. Nach MEHRISHI (28) wandern Leukämiezellen im elektrischen Feld etwa genauso schnell, wie gesunde Zellen. Diese unterschiedlichen Befunde muß man wohl auf verschiedenes Zellmaterial und verschiedene Medien zurückführen. Ausführlich beschriebene Veränderungen an Tumorzellen sind der Verlust bzw. das Neuentstehen von Oberflächenantigenen (8, 40), bestimmten Proteinen und Enzymen (10, 8), Oligosacchariden (35) und Veränderungen in der osmotischen und thermischen Resistenz (30).

Pseudoisocyaninchlorid bindet sich als Kation an anionische Gruppen. Bei der Anlagerung an Polyanionen wie Nukleinsäuren und Glykosaminoglycane bildet PIC sogenannte J-Aggregate, d. h. durch eine Matrizenfunktion der Polyanionen aggregiert der Farbstoff zu Polymeren, was sich in einer Verschiebung des längstwelligigen Elektronenüberganges zu größeren Wellenlängen äußert (15). Diese seltene Eigenschaft ist die Ursache für die selektive Darstellung dieser Polyanionen. Dabei müssen die Abstände der negativen Ladungen in einem bestimmten Bereich liegen, der die Aggregatbildung fördert. Zur Erklärung der PIC-Granula an Lymphozyten kommen im Prinzip fünf Möglichkeiten in Betracht:

1. Nukleinsäuren; 2. Glykosaminoglycane; 3. Neuraminsäure;
4. Proteine; 5. Phosphatgruppen von Phospholipiden.

Da die Granula nur bis zu einer Stunde in vitro nachweisbar

sind, muß es sich um sehr labile Strukturen handeln. Entweder lösen sich die anfärbbaren Bestandteile schon nach so kurzer Zeit ab, oder sie werden durch EDTA bzw. Heparin chemisch verändert, oder es tritt eine Änderung in der Ordnung der Membran ein, im Sinne einer Desaggregation. Welchem Geschehen hier die Hauptbedeutung zukommt, läßt sich im Augenblick noch nicht sagen.

Ad 1: Nukleinsäuren wurden bisher nur als RNA an der Zelloberfläche nachgewiesen. In unserem Fall scheint die RNA keine Bedeutung zu haben, da die Behandlung mit Ribonuklease an den Lymphozyten keine Veränderungen in der Granulation ergab.

Ad 2: Glykosaminoglycane wurden an der Zellmembran bisher nicht beschrieben. Chondroitinase ABC verändert die Färbung mit PIC nicht. Beides spricht gegen Glykosaminoglycane.

Ad 3: Behandlung mit Neuraminidase verändert die Granulationen nicht. Das spricht gegen Neuraminsäure.

Ad 4: Um als Polyanionen zu wirken, müßten die Proteine sehr viele Carboxylgruppen in sterischer Ordnung besitzen. Das erscheint eher unwahrscheinlich.

Ad 5: Durch Phospholipase C, die den Phosphatrest vom Lipid abspaltet, wird die Zellmembran verändert. Noch besser läßt sich mit lipophilen Substanzen, wie Chloroform oder Benzol ein Verschwinden der Granula erreichen. Dieser Befund deutet darauf hin, daß es sich dabei um

Phospholipide handelt, möglicherweise um einen besonderen Typ von Phospholipiden, die örtlich gruppiert sind, oder sich in einer sterischen Ordnung befinden, die die PIC-Bindung erleichtert. Denkbar wären auch größere Lipid-Protein Komplexe. Nicht auszuschließen ist, daß das Ganze ein Artefakt ist, indem das PIC die Bildung von solchen Komplexen erst begünstigt. Diese Überlegungen können hier nur ein Anstoß für differenziertere biochemische Untersuchungen sein.

Zusammenfassung.

Es wird eine neue Färbemethode von Leukozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pseudoisocyaninchlorid beschrieben. Dabei weisen Lymphozyten regelmäßig multiple Granula auf, Granulozyten nicht. Die Untersuchung eines Kollektives von 100 Gesunden und Kranken zeigt eine Granulation der Lymphozyten von je 97 - 100%. Bei 15 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, davon 11 Leukämien, ist dieser Prozentsatz häufiger erniedrigt, in einem Fall auf 0%. Die Natur der angefärbten Lymphozyten-Granula ist nicht geklärt. Eigene Versuche legen Membranstrukturen nahe, möglicherweise Phospholipid- oder Phospholipid-Protein-Komplexe. In der Literatur liegen bisher keine vergleichbaren Beobachtungen vor.

Literaturverzeichnis

- 1) Allan D., Crumpton M.J.: Isolation and Composition of Human Thymocyte Plasma Membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 274, 22-27 (1972).
- 2) Ambrose E.J.: Biochem. and Biophys. Properties of Cell Membranes, in: *Proc. of the 7th Canadian Cancer Res. Conf.* S. 247-264. Toronto 1967.
- 3) Begemann H.: *Klin. Hämatologie*, 2. Aufl. Stuttgart 1975.
- 4) Bey E.: *Diss. Univ. München* 1964.
- 5) Billings-Gagliardi S.: Surface Coats on Human Lymphocytes: Freeze-Drying and Staining with Cations. *Am. J. Anat.* 154 (2), 267-276 (1979).
- 6) Bona C., Anteunis A.: Structure of the Lymphocyte Membrane. *Ann. Immunol.* 124, 321-344 (1973).
- 7) Borysenko J.Z., Woods W.: Density, Distribution and Mobility of Surface Anions on a Normal/Transformed Cell Pair. *Exp. Cell Res.* 118, 215-227 (1979).
- 8) Cohnen G.: T- und B-Lymphozyten bei chronischer lymphatischer Leukämie und Lymphogranulomatose. Stuttgart 1975.
- 9) Cook G.M.W., Jacobson W.: The Electrophoretic Mobility of Normal and Leukaemic Cells of Mice. *Biochem. J.* 107, 549-557 (1968).
- 10) Emmelot P.: Biochem. Properties of Normal and Neoplastic Cell Surfaces. *Europ. J. Cancer* 9, 319-333 (1973).
- 11) Freter C.E., Ladenson R.C., Silbert D.F.: Membrane Phospholipid Alterations in Response to Sterol Depletion of LM-Cells. *J. Biol. Chem.* 254, 6909-6916 (1979).
- 12) Gerlach E., Moser K., Deutseh E.: 2nd int. Symposium on Metabolism and Membrane Permeability of Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes. Stuttgart 1973.

- 13) Gottfried E.L.: Lipids in Human Leukocytes.
J. Lipid Res. 12, 531-537 (1971).
- 14) Gourdin M.F.: Surface Features of Cells in Human Lympho-
proliferative Disorders. Hämatol. u. Bluttransf. 19,
207-219 (1967).
- 15) Gschwind K.: Zur Struktur von Pseudoisocyanin-Aggregaten.
Diss. TU München 1974.
- 16) Hawkes S.P.: Surface Difference of Normal and Trans-
formed Cells as Detected by a New Fluorescent Labeling
Technique. Prog. Clin. Biol. Res. 9, 149-158 (1976).
- 17) Inbar M., Shinitzky M.: Cholesterol as a Bioregulator
in the Development and Inhibition of Leukaemia.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4229-4231 (1974).
- 18) Inbar M., Shinitzky M., Sachs L.: Microviscosity in the
Surface Membrane Lipid Layer of Intact Normal Lympho-
cytes and Leukaemic Cells. FEBS letters 38, 268-270 (1974).
- 19) Karlson P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. 9. Aufl.
Stuttgart 1974, S. 211-222.
- 20) Ladoulis C.T.: Lymphocyte Plasma Membranes I: Thymic
and Splenic Membranes from Inbred Rats.
Biochim. Biophys. Acta 356, 27-35 (1974).
- 21) Lesseps R.J.: Removal by Phospholipase C of a Layer of
Lanthanum-Staining Material External to the Cell Membrane
in Embryonic Chick Cells. J. Cell Biol. 34, 173-183 (1967).
- 22) Lin P.S., Cooper A.G., Wortis H.H.: Scanning Electron
Microscopy of Human T-Cell and B-Cell Rosettes.
New Engl. J. Med. 289, 548-551 (1973).
- 23) Love L.A.: Lymphocyte Fluorescent Profile (LFP).
Cancer Lett. 6(6), 357-364 (1979).
- 24) Lucy J.A.: Lipids and Membranes. FEBS Lett. 405, 105-111
(1974).

- 25) Marique D., Hildebrand J.: Isolation and Characterisation of Plasma Membranes from Human Leukemic Lymphocytes. *Cancer Res.* 33, 2761-2767 (1973).
- 26) Maugh T.H., Marx J.L.: *Zerstörendes Wachstum.* Stuttgart 1979.
- 27) Mayhew E., Weiss L.: Ribonucleic Acid in the Periphery of Different Cell Types, and Effect of Growth Rate on Ionogenic Groups in the Periphery of Cultured Cells. *Exptl. Cell Res.* 50, 441-543 (1968).
- 28) Mehrishi J.N.: Molecular Aspects of the Mammalian Cell Surface in: Butler J.A.V., Noble D.: *Progress in Biophysics and Mol. Biol.* 25, 1-68 (1972).
- 29) Mehrishi J.N.: Topochemistry of the Surface of some Human Blood Elements. *Bibl. Anat.* 11, 260-271 (1973).
- 30) Miura e.a.: A Study of Leukemic Cell Injury by Physical Agents. *Cancer Res.* 31, 1451ff (1971).
- 31) Nicolson G.L.: A Rapid Method for Determining the Topological Distribution of Anionic Sites on Membrane Surfaces. *J. Supramol. Structure* 1, 159-164 (1972).
- 32) Nicolson G.L.: Factors Influencing the Dynamic Display of Lectin-Binding Sites on Normal and Transformed Cell Surface, in: *Control of Proliferation in Animal Cells*, hrsg. v. Clarkson B., Baserga R., S. 81, Cold Spring Harbor Lab., New York 1974.
- 33) Oseroff A.R., Robbins P.W., Burger M.M.: The Cell Surface Membrane: Biochem. Aspects and Biophys. Probes. *Ann. Rev. Biochem.* 42, 647-682 (1973).
- 34) Romhányi G.: Ultrastructural Differences in Cell Membranes of Erythrocytes, Myeloid and Lymphoid Cells as Shown by Topo-Optical-Reactions. *Histochemistry* 39, 261-276 (1974).
- 35) Rueff F.: *Die Zellelektrophorese in der klinischen Diagnostik.* München 1964.

- 36) Rueff F.V., Fuhrmann G.F., Ruhenstroth-Bauer G.: Die Zellelektrophorese in der klinischen Diagnostik. MMW 24, 1242-1250 (1963).
- 37) Ruhenstroth-Bauer G.: The Normal and Pathological Haemogram of Man, in: Ambrose E.J.: Cell Elektrophoresis, S. 66-72, London 1965.
- 38) Ruzicka F.: Lymphocyte Membrane in the Freeze-Etching Picture. Blut 28, 131-135 (1974).
- 39) Schroeder F.: Differences in Fluidity between Bilayer Halves of Tumor Cell Plasma Membranes. Nature 276, 528-530 (1978).
- 40) Schweitzer M.: Studies on Tumor Immunity and Lymphocyte Kinetics in Vitro in Acute and Chronic Lymphatic Leukemia. Diss. Amsterdam 1973.
- 41) Shinitzky M., Inbar M.: Difference in Microviscosity Induced by Different Cholesterol Levels in the Surface Membrane Lipid Layer of Normal Lymphocytes and Malignant Lymphoma Cells. J. Mol. Biol. 85, 603-615 (1974).
- 42) Singer S.J., Nicolson G.L.: The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. Science 175, 720-731 (1972).
- 43) Suschke J.: Glykosaminoglycane in Blut- und Knochenmarkzellen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Laboratoriumsmedizin 2 (1977).
- 44) Suschke J., Gschwind G., Rohde G.: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis saurer Mukopolysaccharide in menschlichen Blut- und Knochenmarkszellen. Klin. Wschr. 54, 289-290 (1976).
- 45) Temmink J.H.: Surface Morphology and Agglutination of Lectin-Treated Human Lymphocytes and Lymphoblasts. J. Cell Sci. 21, 563-578 (1976).
- 46) Vlodavsky I.: Difference in the Cell Cholesterol to Phospholipid ratio in Lymphocytes and CLL Cells. Nature 250, 67-68 (1974).

- 47) Warley A.: The Isolation and Characterisation of Plasma Membranes from Normal and Leukemic Cells of Mice. *Biochim. Biophys. Acta* 323, 55-68 (1973).
- 48) Weiss L.: Neuraminidase, Sialic Acids and Cell Interactions. *J. Natl. Canc. Inst.* 50, 3-19.
- 49) Weiss L, Sinks L.F.: The Elektrokinetic Surfaces of Human Cells of Lymphoid Origin and their Ribonuclease Susceptibility. *Cancer Res.* 30, 90-94 (1970).
- 50) Weiss L., Mayhew E.: The Presence of RNA within the Peripheral Zones of Two Types of Mammalian Cells. *J. Cell. Physiol.* 68, 345-360 (1966).
- 51) Yanovich S.: Dynamic Parameters of Membrane Lipids in Normal and Leukemic Human Lymphocytes. *Cancer Res.* 38(12), 4654-4661 (1978).
- 52) Zucker-Franklin D.: Differences in the Behavior of the Membrane and Membrane-Associated Filamentous Structures in Normal and CLL Lymphocytes. *J. Immunol.* 122, 97-107 (1979).

L e b e n s l a u f

Am 11. Oktober 1954 wurde ich in Erding als Sohn des Kaufmanns Max Schöberl und seiner Frau Else, geb. Bergmann, geboren. Die Volksschule besuchte ich vier Jahre lang im angrenzenden Altenerding und trat 1964 in den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums Erding über. Nach dem Abitur 1973 studierte ich zuerst zwei Semester Informatik an der TU München. Anschließend absolvierte ich meinen Zivildienst in der Krankenpflege. Im Herbst 1975 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität München. Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten nahm ich im November 1980 an der Kinderpoliklinik der Universität München auf. Seit Juni 1981 bin ich verheiratet und lebe in Olching.

